

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 58-213711
 (43) Date of publication of application : 12.12.1983

(51) Int. Cl.

A61K 9/10
 A61K 9/56
 // A61K 31/40
 A61K 31/555

(21) Application number : 57-234993

(71) Applicant : TSUCHIDA HIDETOSHI

(22) Date of filing : 28.12.1982

(72) Inventor : HASEGAWA ETSUO
 MATSUSHITA YOICHI
 TSUCHIDA HIDETOSHI

(30) Priority

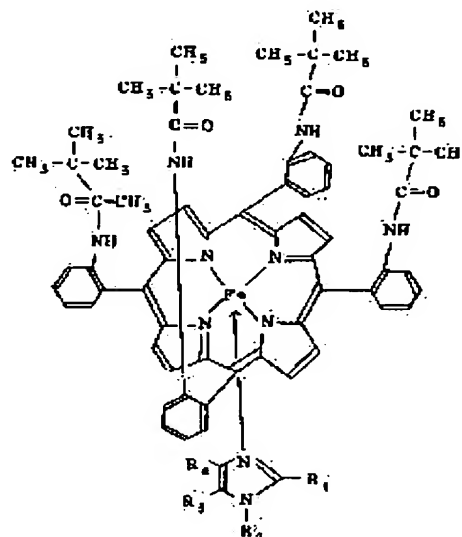
Priority number : 82 386060 Priority date : 07.06.1982 Priority country : US

(54) LIPOSOME INCLUDING IRON (2) PORPHYRIN COMPLEX AND AGENT TO ADSORB AND TO DESORB OXYGEN

(57) Abstract:

PURPOSE: An agent to absorb and to desorb oxygen having improved adaptability to organism without causing the fragility of erythrocyte, obtained by including an iron (II)-5,10,15,20-tetra($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-pivalamidophenyl)porphyrin complex in liposome consisting of phospholipid and cholesterol.

CONSTITUTION: An iron (II)-5,10,15,20-tetra($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-pivalamidophenyl)phophyrin complex shown by the formula (R1 is not bulky group not inhibiting the coordination of imidazole bonded to it to central iron; R2, R3, and R4 are H, or hydrophobic substituent group, and at least one of them is hydrophobic substituent group) is included in liposome consisting of phospholipid (preferably phosphatidylcholine) and cholesterol. A weight ratio of the phospholipid to cholesterol is 1W100, preferably 2W50, and a weight ratio of the phospholipid-cholesterol mixture to porphyrin is 10W1,000, preferably 50W200.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58-213711

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和58年(1983)12月12日

A 61 K 9/10

7057-4C

9/56

7057-4C

// A 61 K 31/40

発明の数 2

31/555

審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑮ 鉄(II)ポルフィリン錯体を包接したリポソーム
および酸素吸脱着剤

⑯ 発明者 松下洋一

徳島市助任本町7番地3

⑰ 特 願 昭57-234993

⑯ 発明者 土田英俊

東京都練馬区関町1丁目141番地

⑰ 出 願 昭57(1982)12月28日

優先権主張 ⑱ 1982年6月7日 ⑲ 米国(US)

⑰ 出 願 人 土田英俊

東京都練馬区関町1丁目141番地

⑳ 386060

㉑ 発明者 長谷川悦雄

㉒ 代理人 弁理士 鈴江武彦

外2名

徳島市川内町松岡13番地69

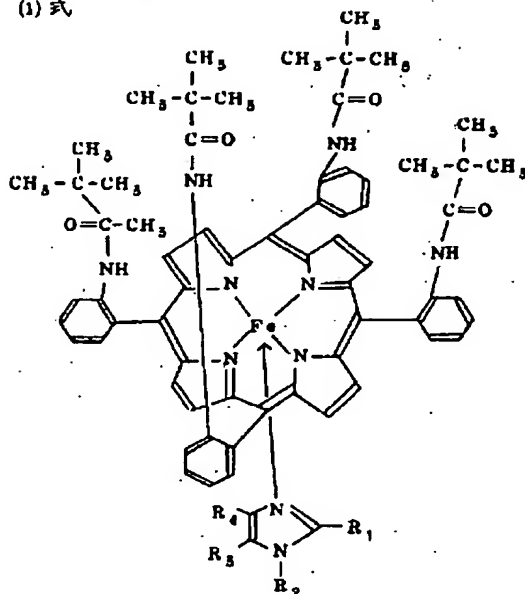
明 細 書

1. 発明の名称

鉄(II)ポルフィリン錯体を包接したリポソーム
および酸素吸脱着剤

2. 特許請求の範囲

(1) 式



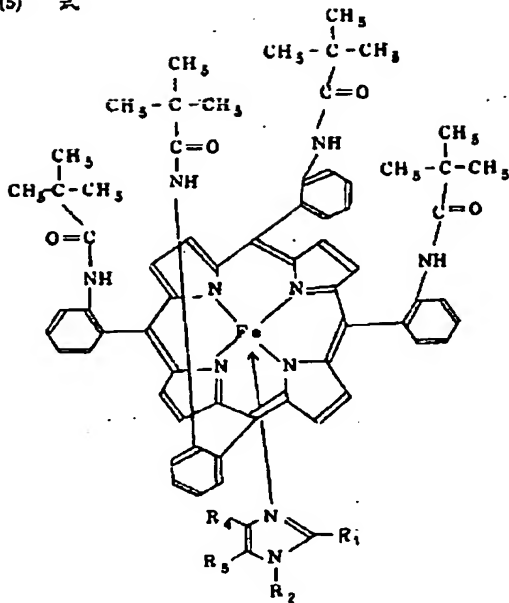
(ここで、 R_1 はこれが結合したイミダゾールの中心鉄への配位を阻害しない嵩高くない基、 R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素または疎水性置換基であってそれらの内少なくとも1つは疎水性置換基)で示される鉄(II)-5,10,15,20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-ビパラミドフェニル)ポルフィリン錯体を包接したことを特徴とするリン脂質とコレステロールからなるリポソーム。

(2) R_1 がメチル基、エチル基またはプロピル基である特許請求の範囲第1項記載のリポソーム。

(3) R_3 および R_4 がそれぞれ水素であり、 R_2 が $C_8 \sim C_{50}$ アルキル基またはトリチル基もしくは置換トリチル基あるいはカルボン酸アルキルエステル基である特許請求の範囲第1項または第2項記載のリポソーム。

(4) リン脂質がホスファチジルコリンである特許請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載のリポソーム。

(5) 式



(ここで、 R_1 はこれが結合するイミダゾール基の中心鉄への配位を阻害しない基、 R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素または疎水性置換基であってそれらの内少なくとも1つは疎水性置換基)

リン錯体は酸素分子を可逆的に吸脱着する。このような天然のポルフィリン鉄(II)錯体と類似の酸素吸脱着機能を持つ錯体を合成するために、従来、多くの研究が発見されている。その例としては、J. P. Collman, *Accounts of Chemical Research* 10 265 (1977); F. Basolo, B. M. Hoffman および J. A. Ibers, *ibid.*, 8 384 (1975) などである。特に、室温条件下で安定な酸素錯体が生成できると報告されているポルフィリン鉄(II)錯体として鉄(II)-5,10,15,20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-ピラミドフェニル)ポルフィリン錯体(J. P. Collman 他, *Journal of American Chemical Society* 97 1427 (1975) 参照)がある。しかし、この錯体は少量でも水が共存すると、直ぐに酸化されるため、酸素錯体を生成できなくなる。

これを解決し、水中、室温下という生理的条件下に近い条件下で可逆的な酸素吸脱着・運搬が可能な材料として本発明者は鉄(II)-

5,10,15,20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-ピラミドフェニル)ポルフィリン錯体を包接したことを特徴とするリン脂質リポソームよりなる酸素吸脱着剤。

(6) R_1 がメチル基、エチル基またはプロピル基である特許請求の範囲第5項記載の酸素吸脱着剤。

(7) R_3 および R_4 がそれぞれ水素であり、 R_2 が $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基またはトリチル基もしくは置換トリチル基あるいはカルボン酸アルキルエステル基である特許請求の範囲第5項または第6項記載の酸素吸脱着剤。

(8) リン脂質がホスファチジルコリンである特許請求の範囲第5項ないし第7項のいずれかに記載の酸素吸脱着剤。

3. 発明の詳細な説明

この発明はいわゆる鉄(II)ポルフィリン錯体を包接したリン脂質リポソームおよび該リポソームからなる酸素吸脱着剤に関する。

ヘモグロビンやミオグロビンの鉄(II)ポルフィ

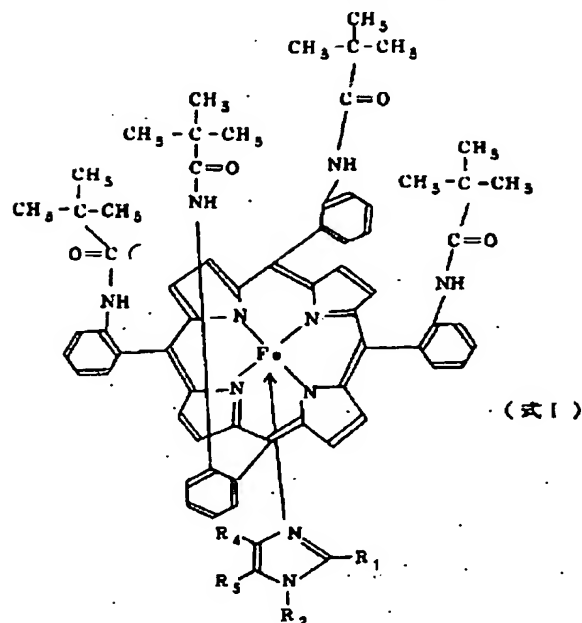
5,10,15,20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-ピラミドフェニル)ポルフィリン-イミダゾール誘導体錯体を包接したリン脂質リポソームを特願昭56-89312号として出願した。このリポソームは前記錯体を包接するものとして天然または合成のリン脂質のみを用いている。

しかしながら、上記のような材料を、酸素運搬機能を有する代用血液として医用面で利用することを考えた場合、リン脂質のみからなるリポソームを用いることは望ましいものとはいえない。すなわち、このようなりポソームを動物静脈内に多量に投与した場合、その動物の赤血球や組織細胞からその主要構成成分の一つであるコレステロールが、該投与されたりポソーム中へ引き抜かれ、該動物の赤血球の脆弱化や血中遊離コレステロール量の増加を誘起するという欠点がある。

したがって、この発明は、上記鉄(II)ポルフィリン錯体を包接したリン脂質リポソームの利点を損なうことなく上記欠点を解決したりポソ-

ムを提供することを目的とする。

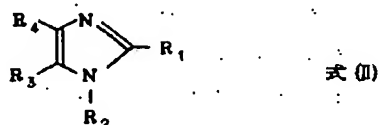
この発明によれば上記目的は一般式



(ここで、 R_1 はこれが結合するイミダゾール基

レステロールとの質量比は、1 ないし 100 であり、より好ましくは 2 ないし 50 である。

$Fe(III)TPIVPP$ 錯体は単独では酸素を配位により吸脱着する作用はほとんどなく、この目的を達成するためには軸位(第5または第6配位座)に塩基性配位子を配位させる必要がある。この発明では、この軸配位子として前記式Iに示すように、式



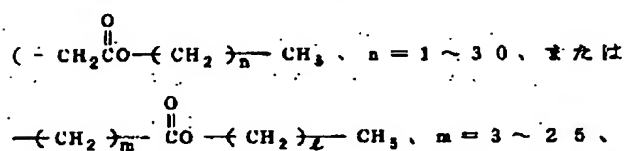
で示される置換イミダゾールを用いている。ここで、 R_1 は当該イミダゾールの $Fe(III)TPIVPP$ への配位を阻害しない基であり、メチル基、エチル基およびプロピル基(ノ-プロピル基およびイソプロピル基を含む)が好ましい。 R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素または疎水性基であって、少なくとも1つは疎水性基である。疎水性基であるのは通常 R_2 または R_3 ことに R_2 である。

の中心鉄への配位を阻害しない基、 R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素または疎水性置換基であってそれらの内少なくとも1つは疎水性置換基で示される鉄(III)-5,10,15,20-テトラ(α , α , α -0-ピバロイルフェニル)ポルフィリン(以下、 $Fe(III)TPIVPP$)錯体をリン脂質とコレステロールからなるリポソームに包接させることによって達成できる。

上記 $Fe(III)TPIVPP$ を包接するリポソームを形成する成分の一つであるリン脂質としては、レシチン、ケファリン、ホスファチジルコリン(大豆、牛肝臓、牛脳、牛心筋および卵黄ホスファチジルコリン等天然のものや、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン等合成のもの)、ホスファチジエタノールアミン、スフィンゴミエリン等を単独でまたは混合物として用いることができる。

この発明に用いられるリポソームのもう一つの成分はコレステロールである。リン脂質とコ

このような疎水性基の例を挙げると、 $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基またはトリチル基もしくは置換トリチル基あるいはカルボン酸アルキルエステル基



換イミダゾールは2位に上記置換基(R_1)を持つとともに疎水性基を持つことが重要である。本発明者らの研究によれば、疎水性基を持たない置換イミダゾール例えば1,2-ジメチルイミダゾールを軸配位子とし持つ $Fe(III)TPIVPP$ 錯体ではこれをリン脂質リポソームに包接させても安定な酸素錯体を形成せず直ちに酸化する。また、疎水性基の疎水性が増す(例えばアルキル基にあっては炭素数が増す)程、当該錯体のリポソームへの包接は良好となり、かつ生成する酸素錯体は水による酸化を受け難くなって安定化する。

Fe(II) Tplv PPをリン脂質リボソームに包接させるには、不活性ガス雰囲気(例えば、窒素ガス、セアルゴンガス)中で、Fe(II) Tplv PPおよび還剤の置換イミダゾール(イミダゾール/ポルフィリンモル比=2~100)を適当な溶媒例えばクロロホルム、ジクロルメタン、ベンゼン、トルエンに溶解し、これに亜ニチオン酸ナトリウム等の還元剤の水溶液を加え、振とう・攪拌し、水-有機溶媒不均一系中でFe(II) Tplv PPの中心鉄を二価に還元する。ついで、この有機層を集め脱水処理後この溶液にリン脂質とコレステロールとの混合物を加える(リン脂質-コレステロール混合物とポルフィリンの重量比は10ないし1000、好ましくは50ないし200)。その後、この系から溶媒を減圧下に留去し、例えばフラスコの内壁面上の薄膜として固形分を得る。これらの操作は不活性ガス下あるいはCOガスを吹き込んでおこなってもよい。COガスを使用した場合には、最後に加熱脱気によってこれを簡単に除去できる。

下で還元しFe(II) Tplv PP溶液を調製し、パラジウムカーボンをろ別して得たる液を用いてもよい。

あるいはまた、Fe(II) Tplv PPを包接したリボソーム分散液を同様に調製し、還元剤としてβ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP⁺)、D-グルコース-6-リン酸(G6P)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、フェレドキシンおよびフェレドキシン-NADPリダクターゼ(F-NADPR)よりなる酵素系を鉄(II)ポルフィリン錯体1モル当りD-グルコース-6-リン酸が1モル以上となる割合で用い、5ないし9のpHの下で還元をおこなってFe(II)をFe(III)とすることもできる。この酵素系にカタラーゼを適量添加しておくとも好ましい。

Fe(II) Tplv PPを包接したリボソームの平均粒径は、上記調製法のうち超音波処理操作の出力および時間の制御により数μm~200Åの範囲で調節できる。

こうして得たこの発明に係るリボソームは、

次に、上記薄膜固体に不活性ガス雰囲気下で水系媒質(例えば、水、リン酸緩衝水(pH=5~9)、生理食塩水、Krebs-Ringers溶液、あるいはこれらにデキストラン、ヒドロキシエチルスターチ、アルブミン等の血液増量剤やアミノ酸、糖類、ビタミン等を溶解した水溶液)を加えた後、振とうあるいはミキサーで攪拌し、することによって乳濁状の多重層リボソーム酸としてFe(II) Tplv PPを包接したリボソーム分散液が得られる。これをさらに超音波処理することによって多重層リボソームをより極小の小さな多重層リボソームもしくは単重層リボソームとすることができる。

なお、前記の亜ニチオン酸ナトリウム水溶液による還元の前記に、パラジウム-カーボン/水素ガスによる還元も利用できる。例えば、Fe(II) Tplv PPとイミダゾール配位子とを乾燥ジクロルメタンあるいはベンゼン/メタノール混合溶媒に溶解し、少量のパラジウムカーボンを添加し、これに水素ガスを充分に吹き込み室温

その中に包接されたFe(II) Tplv PPの、酸素分圧差による可逆的酸素吸脱着機能を安定に発揮させ、該Fe(II) Tplv PPは室温下、水の共存下でも安定な酸素錯体を形成し、酸素吸脱着剤として機能する。また、Fe(II) Tplv PPを包接するリン脂質とコレステロールよりなるリボソームは特にコレステロールの存在によりより優れた生体適合性がある。したがって、この発明のリボソームは生体適合性のより高い(すなわち、赤血球の脆弱化や血中遊離コレステロールの増加を招かない)酸素吸脱着剤の特徴を持つこととなる。

また、コレステロールを用いることにより、リポソーム自体の安定性も増す。

以下、この発明の実施例を記す。

実施例 1

窒素ガス雰囲気下において、 $\text{Fe}(\text{II})\text{TpiV PP}\cdot\text{Br}$ 1mg (8.7×10^{-4} ミリモル)、1- α -ラウリル-2-メチルイミダゾール 11mg (4.3×10^{-2} ミリモル) をトルエン 5 ml に溶解し、これに過剰の亜ニチオン酸ナトリウムを溶解した水溶液 5 ml を加え振盪後、一酸化炭素ガスを吹き込んだ。静置後、トルエン層を採取し、少量のモレキュラーシーブス 4 Å を加え、脱水処理した。このトルエン溶液に、卵黄ホスファチジルコリン (以下、PC と略記する) 0.13g とコレステロール 0.014g をトルエン 2 ml に溶解し一酸化炭素ガスをあらかじめ飽和させておいたものを加えた。トルエンを減圧留去してフラスコの内壁面上に残った薄膜状固体物質を、さらに 100°C で 0.5 時間減圧処理して一酸化炭素を完全に除去した。ついで、これに、酸素ガスを除去したリン酸緩衝

水 (pH 7.0) 10 ml を加えた後、酸素ガス下において超音波攪拌 (20 kHz, 100 W) を 10 分間行い、5, 10, 15, 20-ナトラ ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -(0-ピペラミドフェニル) ポルフィン鉄(II)-モノ(1- α -ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体の多重層リポソーム分散水溶液を得た。窒素ガス下における溶液の可視吸収スペクトルの吸収極大波長 λ_{max} は 532, 552 nm の 2 本であり、デオキシ型に相当した。吸収スペクトルの形および吸収極大波長は、無水ベンゼン溶液などにおける同種錯体の文献値とも一致している。

なお、本実施例で用いた 1- α -ラウリル-2-メチルイミダゾールは、次のように合成した。

2-メチルイミダゾール 19g (0.23 mole)、臭化ラウリル 25g (0.10 mole) を混合し 200°C に 10 時間加熱反応した。冷却後 10% K_2CO_3 水溶液 500 ml を加え攪拌したのち、エーテル抽出 (2 × 300 ml) した。有機層を合

わせて、飽和 NaHCO_3 水溶液 (2 × 200 ml)、飽和 NaCl 水溶液で洗滌後、分液して乾燥 Na_2SO_4 で乾燥した。蒸発に供した後褐色油状物を得、これを、シリカゲルカラム (シリカゲル 500g; CHCl_3 : $\text{MeOH} = 10:1$) で精製した。収量 20gr、収率 79%。これを減圧蒸留し、沸点 156 ~ 158°C / 4 mm Hg 留分を用いた。

マススペクトル: $M^+ = 250$, $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CDCl_3 , TMS):

δ (ppm) 6.88 (d, $J = 1 \text{ Hz}$), 6.76 (d, $J =$

1 Hz): 1m4位, 5位 protons

3.89 (2H, t, $J = 7 \text{ Hz}$): 1位

$\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$

2.36 (3H, s): 1m2位の CH_3

IR スペクトル (NaCl 板) cm^{-1} : 3400, 2930,

2860, 1625, 1500, 1465, 1425, 1375,

1280, 1145, 995, 720, 680

実施例 2

実施例 1 で得たリポソーム分散水溶液 (窒素ガス雰囲気下) に 25°C で酸素ガスを吹き込む

と、デオキシ型の 2 本のピークに代って λ_{max} 546 nm の単ピークが新たに観測され、無水トルエン溶液中におけるこの種の $\text{Fe}(\text{II})\text{TpiV PP}$ 錯体の酸素化錯体の文献値と一致している。この酸素化錯体溶液に窒素ガスを短時間バブリングすることにより、デオキシスペクトルへの可逆的変化が観測され、可逆的な酸素吸脱着を確認した。また、得られた酸素錯体の吸収スペクトルの経時変化の追跡から求めた酸素錯体の半寿命は、25°C で約 4 時間以上であった。

実施例 3

実施例 1 の還元型調製法に従って

$\text{Fe}(\text{II})\text{TpiV PP}\cdot\text{Br}$ 3.6mg (3.15×10^{-4} モル)、

1-ラウリル-2-メチルイミダゾール 43mg

(50 倍当量)、PC 0.56g (250 倍当量)

およびコレステロール 0.056g を用い、生理食塩水 (pH 6.8) 20 ml 中で還元体のリポソーム溶液を作った。これを N_2 下水浴中で超音波処理 (20 kHz, 150 W; 1.5 hr) を行ないほとんど透明なリポソーム分散溶液とした。

この溶液を用いて室温下で O_2 錯体の可逆的吸脱着のチェックと、安定性のチェック(経時変化)を行なった。実施例2と同様に、酸素ガスを溶液に吹き込むことにより酸素化錯体に相当する可視吸収スペクトルを得た。又、この溶液に酸素ガスを吹き込むことにより、もとのデオキシ体スペクトルが得られ、酸素の可逆的吸脱着を確認した。また、上記の酸素錯体の半寿命は、25℃において4時間以上であった。

実施例4

実施例1において卵黄ホスファチジルコリン0.13gとコレステロール0.014gの混合物の代わりに卵黄ホスファチジルコリン0.13gとコレステロール0.042gとの混合物を用いた以外は全く同様の手法により5, 10, 15, 20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -0-ピペラミドフェニル)ポルフィン鉄(II)-モノ(1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体のリポソーム分散液を得た。酸素ガス下におけるこの分散液の可視吸収スペクトルの λ_{max} は532nm, 560nmであ

メチルイミダゾールは、次のように合成した。2-メチルイミダゾール-Ag塩4.3g(0.029モル)をトルエン50mlに懸濁撹拌し塩化トリチル7.0g(0.025モル)を加え10hr加熱還流した。室温に戻し不溶部(AgBr)を分別し、溶液を濃縮し黄褐色固体を得た。シリカゲルカラム(シリカゲル200g, $CHCl_3/MeOH = 20/1$)で精製し、ベンゼン-ヘプタン系から再結晶した。収量3.34g、収率45%。マススペクトル: M^+ 324。 1H -NMRスペクトル($CDCl_3$, TMS) δ (ppm): 7.00~7.40(15H, m): フェニルプロトン 6.86, 6.76(each 1H, d, $J=1$ Hz): イミダゾール4位, 5位-プロトン 1.67(3H, s): イミダゾール2位- CH_3 。

IR(KBrディスク): 3350, 3070, 3030, 1600, 1520, 1490, 1450, 1395, 1305, 1240, 1180, 1140, 1070, 1035, 1000, 990, 910, 880, 865, 760, 750, 700 cm^{-1}

った。実施例2と同様に、酸素ガスを溶液に吹き込むことにより酸素化錯体に相当する可視吸収スペクトルを得た。ついで、この溶液に酸素ガスを吹き込むことにより、もとのデオキシ体スペクトル($\lambda_{max} = 544$ nm)が得られ、酸素の可逆的吸脱着を確認した。また、上記の酸素錯体の半寿命は、25℃において4時間以上であった。

実施例5

実施例1において、1-ラウリル-2-メチルイミダゾールを同モル量の1-トリチル-2-メチルイミダゾールに代えた以外は全く同じ手法により、5, 10, 15, 20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -0-ピペラミドフェニル)ポルフィン鉄(II)-モノ(1-トリチル-2-メチルイミダゾール)錯体のリポソーム分散水溶液を得た。可視吸収スペクトルの λ_{max} は、532nmおよび560nmであった。実施例2と同様な手法で、酸素錯体(λ_{max} 543nm)を確認した。

なお、本実施例で用いた1-トリチル-2-

実施例6

実施例1において、卵黄ホスファチジルコリン0.13gを、ジパルミトイルホスファチジルコリン0.18gに代え、更に超音波撹拌操作を、60℃の浴上にて行った以外は全く同様の手法により、5, 10, 15, 20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -0-ピペラミドフェニル)ポルフィン鉄(II)-モノ(1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体のリポソーム分散水溶液を得た。酸素ガス下における溶液の可視吸収スペクトルは λ_{max} 532nm, 562nmであった。実施例2の手法に従い酸素錯体の生成を確認した。上記の酸素錯体の半寿命は、4時間以上であった。

実施例7

実施例1において、1-ラウリル-2-メチルイミダゾールの代わりに同モル量の1-ステアリル-2-メチルイミダゾールを用いた以外は全く同じ手法により5, 10, 15, 20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -0-ピペラミドフェニル)ポル

イン鉄(II)-モノ(1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体のリポソーム分散水溶液を得た。窒素ガス下における溶液可視吸収スペクトルは λ_{\max} 532 nm, 562 nmであった。実施例2の手法に従い酸素錯体の生成を確認した。上記の酸素錯体の半寿命は、4時間以上であった。

本実施例で用いた1-ステアリル-2-メチルイミダゾールは、実施例1において合成した1-ラウリル-2-メチルイミダゾールの合成法に従い、2-メチルイミダゾール14.3gと臭化ラウリル25gより合成した。粗精物をシリカゲルカラム精製(クロロホルム/メタノール=10/1)した後、減圧乾燥した。

マスマスペクトル: $M^+ = 334$ (M_w 334)

IRスペクトル(KBr錠剤) cm^{-1} : 3420, 2980, 2940, 2870, 1510, 1480, 1435, 1385, 1300, 1290, 1140, 1110, 990, 755, 725, 690

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル(CDCl_3 , TMS) δ (ppm):

の様にして合成した。

11-ブロムウンデカン酸25gをベンゼン100ml中塩化オキサリル13ml存在下に4時間室温撹拌した。次にメタノール50mlを加えて一夜放置後常法処理して11-ブロムウンデカン酸メチルエステル23g(収率87.5%)を得た。

2-メチルイミダゾール8.2gをNaH 2.4g/DMF 200mlの懸濁溶液の中ゆっくり加えた。添加後90℃で1時間加熱し、先に得た11-ブロムウンデカン酸メチルエステルを滴下した。続いて2時間90℃で加熱撹拌した後、常法により処理した。

シリカゲルカラム($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 9/1$ (v/v))を用いて精製し、メチル11-(1-(2-メチル)イミダゾリル)ウンデカノエイト9.5g(収率41%)を得た。

IR(液膜): 1740cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$, エステル)

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル(TMS, CDCl_3) δ (ppm): 1.28 (一重線, 12H,

1.7 (t, 2H, Zn-C-CH_2-) 6.89 (d, 1H), 6.80 (d, 1H) (イミダゾールの4位, 5位), 3.80 (t, 2H, N-CH_2-), 2.37 (3H, s, FeCH_3), 1.26 (30H, s, $-\text{CH}_2-$), 0.88 (t, 3H, $-\text{CH}_3$), 元素分析値(重量%) C 79.01 (79.0), H 12.72 (12.6), 8.31 (8.4) $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_2$

実施例8

実施例1において、1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾールのかわりにメチル11-[1-(2-メチル)イミダゾリル]ウンデカノエイト(4.3×10^{-2} ミリモル)を用いた以外は全く同じ手法により5, 10, 15, 20-テトラ($\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -O-ピラミドフェニル)ポルフィン鉄(II)-モノ[メチル11-(1-(2-メチル)イミダゾリル)ウンデカノエイト]錯体のリポソーム分散水溶液を調製した。窒素ガス下における可視吸収スペクトル吸収極大波長 λ_{\max} は533 nmおよび561 nmであった。本実施例で用いたメチル11-[1-(2-メチル)イミダゾリル]ウンデカノエイトは次

$\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$, 1.68 (多重線, 4H) $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-$, 2.31 (三重線, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}_2-$), 2.37 (一重線, 3H, イミダゾール環 $-\text{CH}_3$), 3.66 (一重線, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 3.80 (三重線, 2H, NCH_2-), 6.80 (二重線, H, イミダゾール環5位プロトン), 6.90 (二重線, H, イミダゾール環4位プロトン)

MSスペクトル: $M^+ 280$

本実施例で調製した鉄(II)ポルフィン錯体リポソーム分散水溶液を用い、実施例2に従い酸素錯体の生成を確認した。酸素錯体の λ_{\max} は545 nmであった。半寿命は4時間以上であった。

実施例9

$\text{Fe}(\text{OTf})_2 \cdot \text{PP-Br}$ 1mg (8.7×10^{-4} ミリモル),

1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾール1.1mg (4.4×10^{-2} ミリモル), 卵黄ホスファチジルコリン1.25mgおよびコレステロール20mgをフラスコ中でベンゼン5mlに溶解した

後、室温下真空ポンプで濃縮してフラスコ壁上の薄膜とした。これに0.05Mリン酸緩衝水(pH7.0)10mlを加え、氷冷して酸素ガス下において超音波攪拌(20kHz, 100W)を30分間行ないリポソーム分散溶液とした。

こうして得たリポソーム分散溶液にNADP⁺ 0.5mg、G6P 3.0mg、フェレドキシン0.01mg、フェレドキシン-NADPリダクターゼ(F-NADPR) 0.02mg、カタラーゼ0.05mgを加えたのち、酸素ガスを1時間バブルし、さらに、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ0.01mgをリン酸緩衝水(pH7.0)0.1mlに溶解した液を注入した。これを酸素雰囲気中25℃に保持しながら、鉄(Ⅲ)から鉄(Ⅱ)への還元反応を可視吸収スペクトルで追跡した。時間と共に5, 10, 15, 20-テトラ(α, α, α, α-O-ピペラミドフェニル)ポルフィリン鉄(Ⅲ)-モノ(1-n-ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体に基づく吸収極大位置535nm, 560nmの吸光度が増加し、約5時間後に完全に還元さ

れた。

実施例2に従い、上記還元型リポソーム溶液に酸素ガスを接触させたところ、直ちに酸素錯体の可視吸収スペクトル($\lambda_{max}=544nm$)を得た。この酸素錯体の25℃における半寿命は実施例1の錯体のそれと同等であった。

実施例10

Fe(Ⅱ)TptvPP·Br 1.0mg (8.7×10^{-4} ミリモル)、1-ラウリル-2-メチルイミダゾール11mg (4.4×10^{-2} ミリモル)、ジパルミトイルホスファチジルコリン50mgおよびコレステロール5mgをベンゼン/メタノール=9/1(v/v)混合溶媒10mlに溶解し、10% Pd-Cを少量加え、水素ガスを20分間吹き込んで還元し、解媒を分別したのち、溶媒を減圧乾固して固体とした。これに凍結脱気したリン酸緩衝水(pH7.2)を酸素雰囲気下加え、振とうし乳濁状の溶液とし、さらに超音波処理(20kHz, 100W)を30分間行ない鉄(Ⅲ)-5, 10, 15, 20-テトラ(α, α, α, α-O-ピペラミドフェニル)ポルフィリン

-モノ(1-ラウリル-2-メチルイミダゾール)錯体のほとんど透明なリポソーム溶液を得た。この可視吸収スペクトルは λ_{max} 535, 560nmを示すテオキシ型で、これに酸素ガスを吹き込むと直ちにスペクトルが変化し λ_{max} 544nmの酸素化錯体となる。さらに酸素ガスを吹き込むと λ_{max} 535, 560nmのスペクトルが戻り、可逆的に酸素を吸脱着することを確認した。上記の酸素錯体の半寿命は、4時間以上であった。

実施例11

実施例3で調整した還元体のリポソーム分散溶液(5ml)を真空凍結脱気(1×10^{-4} torr, 4回)したラット血清5mlで希釈し、対照セルに同じラット血清(生理食塩水で1/2希釈)を用いて可視スペクトルを測定した。スペクトルのピーク位置は、既に述べたように、酸素の吸着脱着の繰返しに伴って λ_{max} が546nmの吸収帯と λ_{max} が535, 562nmの吸収帯の間を往復変化する。酸素錯体の半寿命は3時間以上であっ

た。したがって血清中でも生理食塩水中と差がなく血清は悪影響を与えないことおよび血清中でも該リポソーム-Fe(Ⅱ)ポルフィリン錯体が酸素結合能を有することが明らかとなった。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦